

JP03/05375
~~15~~

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

25.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 4月26日

REC'D 20 JUN 2003

出願番号

Application Number:

特願2002-125353

PCT

[ST.10/C]:

[JP2002-125353]

出願人

Applicant(s):

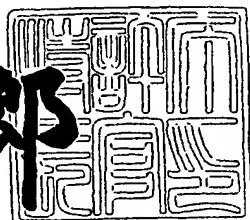
早出 広司

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月 2日

特許長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3041496

【書類名】 特許願
【整理番号】 P-9842
【提出日】 平成14年 4月26日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C07K 14/80
C12N 15/00
【発明の名称】 グルコース脱水素酵素βサブユニット及びそれをコードするDNA
【請求項の数】 11
【発明者】
【住所又は居所】 東京都目黒区南1-13-16
【氏名】 早出 広司
【特許出願人】
【識別番号】 596153357
【氏名又は名称】 早出 広司
【代理人】
【識別番号】 100086667
【弁理士】
【氏名又は名称】 小林 孝次
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 017802
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0016395
【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルコース脱水素酵素 β サブユニット及びそれをコードするDNA

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(A)または(B)に示すタンパク質。

(A) 配列番号16のアミノ酸番号23~425からなるアミノ酸配列を少なくとも有するタンパク質。

(B) 配列番号16のアミノ酸番号23~425からなるアミノ酸配列において、1~20個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、グルコース脱水素酵素 β サブユニットとして機能し得るタンパク質。

【請求項2】 以下の(A)又は(B)のタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号16のアミノ酸番号23~425からなるアミノ酸配列を少なくとも有するタンパク質。

(B) 配列番号16のアミノ酸番号23~425からなるアミノ酸配列において、1~20個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、グルコース脱水素酵素 β サブユニットとして機能し得るタンパク質。

【請求項3】 以下の(a)又は(b)に示すDNAである請求項2に記載のDNA。

(a) 配列番号15の塩基番号187~1398からなる塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号15の塩基番号187~1398からなる塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし得るDNA。

【請求項4】 さらに配列番号15の塩基番号121~187からなる塩基配列を含む請求項3に記載のDNA。

【請求項5】 請求項2~4のいずれか一項に記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項6】 請求項2~4のいずれか一項に記載のDNA又は請求項5に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項7】 請求項6に記載の形質転換体を培養して、前記DNAの発現

産物としてグルコース脱水素酵素 β サブユニットを產生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素 β サブユニットの製造方法。

【請求項8】 さらにブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素 α サブユニット及び γ サブユニットをコードする塩基配列を含む請求項3又は4に記載のDNA。

【請求項9】 請求項8に記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項10】 請求項8に記載のDNA又は請求項9に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項11】 請求項10に記載の形質転換体を培養して、前記DNAの発現産物としてグルコース脱水素酵素複合体を產生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素複合体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、グルコース脱水素酵素の β サブユニットを構成するチトクロームC、それをコードするDNA、及びそれらの利用に関する。グルコース脱水素酵素は、酵素電極を用いたグルコースセンサ等に有用である。

【0002】

【従来の技術】

特定の基質に対して特異的に反応する酵素を用いたバイオセンサの開発は、産業の分野を問わず盛んに行われている。その中でも特にバイオセンサの1つであるグルコースセンサは、主に医療分野で測定方法やその方法を利用した装置の開発が盛んに行われている。例えばグルコースセンサは、1962年にClarkとLyonsによってグルコースオキシダーゼと酸素電極を組み合わせたバイオセンターの報告 (L.c.Clark,J.and Lyons,C."Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery."Ann,n.y.Acad.Sci.105:20-45) が最初にされて以来、約40年ほどの歴史を有している。

【0003】

このように、グルコースセンサに、酵素としてグルコースオキシダーゼが採用

されてからの歴史は長い。なぜならグルコースオキシダーゼは、グルコースに対する基質特異性が高く、熱安定性に優れており、更に酵素の量産化が可能であり、生産コストが他の酵素と比べて安価である、からである。基質特異性が高いということは、酵素がグルコース以外の糖とは反応しないため、測定値に誤差を生じることなく、正確な測定が行なえるという利点に通じる。また、熱安定性に優れているということは、酵素が熱により変性し酵素活性が失活するという問題を防止することができ、長期間正確な測定が行えるという利点に通じる。

【0004】

しかし、グルコースオキシダーゼは、上記の様なメリットを有している反面、例えば溶存酸素の影響を受け、測定結果に影響があるという問題も有している。

一方、グルコースオキシダーゼ以外には、グルコース脱水素酵素（以下、「グルコースデヒドロゲナーゼ」又は「GDH」ともいう）を利用したグルコースセンサの開発も行われてきた。そして、酵素も、微生物から発見されている。例えば、バチルス (*Bacillus*) 属由来のグルコースデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.47) 及びクリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属由来グルコースデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.119) が知られている。

【0005】

前者のグルコースデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.47) は、 β -D-グルコース + NAD(P)⁺ → D- δ -グルコノラクトン + NAD(P)H + H⁺ の反応を触媒する酵素であり、後者のグルコースデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.119) は、D-グルコース + NADP⁺ → D- δ -グルコノラクトン + NADPH + H⁺ の反応を触媒する酵素であり、前述した微生物由来のグルコースデヒドロゲナーゼは、既に市販もされている。

【0006】

これらグルコースデヒドロゲナーゼは、測定サンプルの溶存酸素の影響を受けないという利点を有する。このことは、酸素分圧が低い環境下で測定を行ったり、酸素量が多く要求される高濃度サンプルを測定する場合であっても、測定結果に誤差を及ぼさずに正確に測定することができるという利点に通じる。

【0007】

しかし、従来に見られるグルコースデヒドロゲナーゼは、溶存酸素の影響を受

けない一方、熱安定性が悪く、基質特異性がグルコースオキシダーゼよりも劣るという問題点を有しており、センサに採用される酵素として、グルコースオキシダーゼやグルコースデヒドロゲナーゼの両欠点を補う酵素の提供が望まれていた。

【0008】

尚、本発明者は Sode,K.,Tsugawa,W.,Yamazaki,T.,Watanabe,M.,Ogasawara,N.,and Tanaka,M.,(1996) Enzyme Microb.Technol.19,82-85. や、 Yamazaki,T.,Tsugawa,W.,and Sode,K.,(1999) Appli Biochemi and Biotec.77-79/0325 や、 Yamazaki,T.,Tsugawa,W.,and Sode,K.,(1999) Biotec Lett.21,199-202において、温泉近くの土壌より採取した試料を用い、 GDHについての研究結果を報告している。この試料中の微生物が産出するGDHは補酵素結合型であり、すでに至適反応温度、熱安定性、基質特異性などの酵素学的性質が明らかとなっている（前記文献）。本酵素は高い耐熱性を持つ触媒サブユニット（ α サブユニット）、電子伝達サブユニット（ β サブユニット）、機能不明の γ サブユニットから構成されているヘテロオリゴマー酵素であり、活性のピークを45°Cと75°Cに持つ。また、 γ 、 α サブユニット遺伝子はクローニングされており、上記微生物がブルクホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*) に属すること、及び β サブユニットのN末端アミノ酸配列も明らかにされている（猪瀬 健、東京農工大学修士論文（2001年））。しかし、 β サブユニット遺伝子の構造は未だ報告されていない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ブルクホルデリア属微生物のGDH β サブユニットをコードするDNA A、及びその利用法を提供することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、ブルクホルデリア・セパシア KS1株のGDHに関する研究をさらに進め、GDH β サブユニットをコードするDNA Aを単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 以下の(A)または(B)に示すタンパク質。

(A) 配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列を少なくとも有するタンパク質。

(B) 配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、グルコース脱水素酵素βサブユニットとして機能し得るタンパク質。

(2) 以下の(A)又は(B)のタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列を少なくとも有するタンパク質。

(B) 配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、グルコース脱水素酵素βサブユニットとして機能し得るタンパク質。

(3) 以下の(a)又は(b)に示すDNAである(2)に記載のDNA。

(a) 配列番号15の塩基番号187～1398からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号15の塩基番号187～1398からなる塩基配列とストリングエントな条件下でハイブリダイズし得るDNA。

(4) さらに配列番号15の塩基番号121～187からなる塩基配列を含む(3)に記載のDNA。

(5) (2)～(4)のいずれかに記載のDNAを含有する組換えベクター。

(6) (2)～(4)のいずれかに記載のDNA又は(5)の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

(7) (6)に記載の形質転換体を培養して、前記DNAの発現産物としてグルコース脱水素酵素βサブユニットを産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素βサブユニットの製造方法。

(8) さらにブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素αサブユニット及びγサブユニットをコードする塩基配列を含む(3)又は(4)に記載のDNA。

(9) (8)に記載のDNAを含有する組換えベクター。

(10) (8)に記載のDNA又は(9)に記載の組換えベクターで形質転換された形

質転換体。

(11) (10)に記載の形質転換体を培養して、前記DNAの発現産物としてグルコース脱水素酵素複合体を產生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素複合体の製造方法。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明者らは、ブルクホルデリア・セパシアKS1株のGDH β サブユニットをコードするDNAを検索し、単離した。同菌株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に受託番号第FERM BP-7306として寄託されている。本明細書において、GDH β サブユニットをコードするDNAを、本発明のDNA、「 β サブユニット構造遺伝子」又は単に「 β サブユニット遺伝子」ということがある。

【0012】

本発明者らは、ブルクホルデリア・セパシア KS1株が產生するGDHは、 α サブユニット、 β サブユニット、及び γ サブユニットを含む多量体タンパク質であることを確認している。本発明のタンパク質は、これらのサブユニットのうち、 β サブユニットである。GDHの分光光度解析により、酸化型GDHの吸収波長はグルコノバクターS p.、アセトバクター s p. のデヒドロゲナーゼチトクローム複合体でできているアルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼの吸収波長と類似しており、熱処理によりこの吸収は失われる。このことと、下記に示す β サブユニットの有無によるGDHの至適反応温度の相違から、 β サブユニットはチトクロームCからなっていることが示唆された。

【0013】

以下に、上記GDHの理化学的性質を示す。

①作用：

グルコースの脱水素反応を触媒する。

②還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60kDaと分子量約43kDaを示すサブユニットからなる。

③ TSK gel G3000SW (東ソー(株)製) を用いたゲルfiltrationクロマトグラフィーにおいて、分子量約380kDaを示す。

④ 至適反応温度：

45°C付近 (Tris-HCl緩衝液、pH8.0)。

【0014】

また、 α サブユニット単独では、以下の理化学的性質を示す。

①' グルコース脱水素酵素活性を有する。

②' 還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60kDaを示す。

③' 至適反応温度：

75°C付近 (Tris-HCl緩衝液、pH8.0)。

【0015】

β サブユニットは、ブルクホルデリア・セパシアKS1株の培養物から、GDH活性を指標としてGDH複合体を精製することにより、他のサブユニットとともに取得することができる。GDH活性は、公知のGDHの活性測定と同様の方法で測定することができる。具体的には、例えば次のようにして測定することができる。594 μ Mの1-メトキシフェナジンメトサルフェート(mPMS)および5.94 μ Mの2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に、酵素試料および基質としてグルコースを基質として加え、37°Cでインキュベートする。分光光度計を用いてDCIPの600nmにおける吸光度変化を追跡し、当該吸光度の減少速度を酵素反応速度とする。

【0016】

また、本発明により β サブユニットをコードする遺伝子の塩基配列(配列番号15)が明らかにされたので、この塩基配列を有するDNA又は同DNAがコードするアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードするDNAを適当な宿主で発現させることによっても β サブユニットを製造することができる。配列番号15のオープンリーディングフレーム(ORF)がコードし得るアミノ酸配列を、配列番号16に、示す。タンパク質から決定した β サブユニットのN末端アミノ酸配列は、配列番号16のアミノ酸番号23~38と一致していた。したがって、アミ

ノ酸番号1～22はシグナルペプチドであると推定される。尚、配列番号15及び16において、第1番目のアミノ酸残基はValと記載されているが、Metである可能性が高く、また、翻訳後に脱落している可能性がある。

【0017】

上記アミノ酸配列についてBLASTによるホモロジー検索を行ったところ、ラルストニア・ソアナセアルム (*Ralstonia solanacearum*) 由来のオキシドレダクターゼ脱水素酵素のシトクロムcサブユニットと65%、グルコノバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) 由来のソルビトール脱水素酵素のシトクロムcサブユニットと48%、エルビニア・シプリペディイ (*Eriwinia cypripedii*) 由来のグルコン酸脱水素酵素のシトクロームcサブユニットと44%、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) 由来2-ケトグルコン酸脱水素酵素のシトクロームcサブユニットと塩基配列レベルで55.7%、アミノ酸レベルで46.4%と、全体にわたって高い相同意を示していた。またこれらのシトクロームcのアミノ酸配列中には、ヘム結合モチーフ（配列番号18）配列が保存されていた。これらのことから、本発明の β サブユニットがチトクロームCであることが示された。

【0018】

本発明の β サブユニットは、GDHの β サブユニットとして機能し得る限り、配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列において、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。尚、GDHの β サブユニットとして機能するとは、GDHの酵素活性を損なわずにチトクロームCとして機能することをいう。

【0019】

本発明のDNAは、上記 β サブユニットをコードするDNAであり、例えばブルクホルデリア・セパシアKS1株から取得することができる。本発明のDNAは、本発明を完成する過程においては、ブルクホルデリア・セパシアKS1株の染色体DNAから単離された。本発明のDNAは、例えば、配列番号13及び14に示す塩基配列を有するプライマーを用い、ブルクホルデリア・セパシアKS1株の

染色体DNAを鑄型とするPCRによって、取得することができる。また、本発明によりその塩基配列及び同塩基配列によってコードされるアミノ酸配列が明らかとなったので、これらの配列に基づいて化学合成することによっても取得することができる。また、前記配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーションによって、ブルクホルデリア・セパシアKS1株の染色体DNAから取得することもできる。また、ブルクホルデリア・セパシアの他の菌株からも、同様にしてバリエントを取得することができる。

【0020】

本発明のDNAは、配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものの他、このアミノ酸配列において、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、GDH β サブユニットとして機能するタンパク質をコードするものであってもよい。

【0021】

本発明のDNAとしては、具体的には、配列番号15の塩基番号187～1398からなる塩基配列を含むDNAが挙げられる。また本発明のDNAは、配列番号15又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、 β サブユニットとして機能し得るタンパク質をコードするDNAであってもよい。ストリンジエントな条件としては、70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズする条件、具体的には、1×SSC、0.1%SDS、60℃が挙げられる。

【0022】

本発明のDNA又は同DNAを含む組換えベクターを保持する形質転換体を培養して、同DNAの発現産物としてGDH β サブユニットを産生させ、これを菌体又は培養液から採取することにより、GDH β サブユニットを製造することができる。その際、本発明のGDH β サブユニットをコードするDNAは、さらに α サブユニットをコードするDNA、又はさらに γ サブユニットをコードするDNAとともに発現させることによって、GDH複合体を製造することができる。 γ サブユ

ニット及び α サブユニットを連続してコードするDNA断片は、配列番号18及び19に示す塩基配列を有するプライマーを用いたPCRによって、取得することができる。

【0023】

GDH β サブユニット又はGDH複合体を産生させる微生物としては、大腸菌をはじめとする腸内細菌群、シュードモナス属やグルコノバクター属などのグラム陰性細菌、バチルス・サブチリス等のバチルス属細菌をはじめとするグラム陽性細菌、サッカロマイセス・セレビシエ等の酵母、アスペルギルス・ニガー等の糸状菌が挙げられるが、これらに限られず、異種タンパク質生産に適した宿主微生物であれば用いることができる。

【0024】

本発明のDNAのクローニング又は発現に使用するベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るプラスミド又はファージから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。エシェリヒア・コリ用のベクターとしては、pBR322、pUC18、pUC118、pUC19、pUC119、pTrc99A、pBluescriptあるいはコスマイドであるSuperCosIなどが例示される。一旦本発明のDNAのクローニングに使用したベクターより、発現等に適した他の組換えベクターへの移入は、本発明のDNAを保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法により同DNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによる微生物の形質転換は、例えばエシェリヒア属細菌ではカルシウム処理によるコンピテントセル法、バチルス属細菌ではプロトプラスト法、酵母ではKU法やKUR法、糸状菌ではマイクロマニュピレーション法等の方法によって行うことができる。また、エレクトロポレーション法も広く用いることができる。

【0025】

宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカー等を指標とすればよい。例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつGDHを生成する微生物を選択すればよい。

【0026】

形質転換体の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

【0027】

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、ラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

【0028】

培養温度は菌が生育し、本発明のタンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくは20～42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、GDHが最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を完了すればよく、通常は12～72時間程度である。培地のpHは菌が発育し、本発明のタンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH6.0～9.0程度の範囲である。

【0029】

培養物中の本発明のタンパク質を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、本発明のタンパク質が培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、本発明のタンパク質を含有する溶液と微生物菌体と分離した後に利用される。本発明のタンパク質が菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また、必要に応じて、EDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加して本発明のタンパク質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0030】

上記のようにして得られたタンパク質含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、

さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって精製を行うことにより、精製された本発明のタンパク質を得ることができる。

【0031】

カラムクロマイトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。該精製酵素標品は、電気泳動（SDS-PAGE）的に単一のバンドを示す程度に純化されていることが好ましいが、 α サブユニット又は γ サブユニットが含まれていてもよい。

【0032】

上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉末化して流通させることが可能である。

本発明の β サブユニット及び α サブユニット、もしくは必要に応じてさらに γ サブユニットからなるGDH複合体、又はそれを保持する形質転換体は、グルコースセンサの酵素電極として用いることができる。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明のGDHを固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明のグルコース脱水素酵素をカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをプロッキングする。

【0033】

グルコースの濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、メディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターと

しては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の酵素を固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコースの濃度を計算することができる。

【0034】

また、本発明のβサブユニットを含むGDH複合体は、グルコース等の糖類アッセイキットの構成要素とすることができます。典型的には、キットは、GDH複合体に加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作成のためのグルコースなどの標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う酵素は種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。

【0035】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【参考例1】ブルクホルデリア・セパシア KS1株GDH αサブユニットをコードする遺伝子の単離

<1>ブルクホルデリア・セパシア KS1株からの染色体DNAの調製

ブルクホルデリア・セパシア KS1株より染色体遺伝子を常法に従って調製した。すなわち、同菌株をTL液体培地(ポリペプトン 10g、酵母抽出液 1g、NaCl 5g、KH₂PO₄ 2g、グルコース 5g; 1L, pH 7.2)を用いて、34°Cで一晩振盪した。増殖した菌体を遠心分離機により回収した。この菌体を10mM NaCl、20mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA、0.5% SDS、100 μg/mlのプロテイナーゼKを含む溶液に懸濁し、50°Cで6時間処理した。ここに等量のフェノールークロロホルムを加えて室温で10分間攪拌した後、遠心分離機により上清を回収した。これに終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウムを加え、2倍量のエタノールを重層して中間層に染色体DNAを析出させた。これをガラス棒を用いてすくいとり、70%エタノ

ールで洗浄した後、適定量のTEバッファーに溶解させ、染色体DNA溶液とした。

【0036】

<2>GDH αサブユニットのN末端アミノ酸配列の決定

実施例2と同様にして精製したGDHを凍結乾燥によって濃縮後、12.5%ポリアクリルアミドを用いたSDS-電気泳動法を用いて展開し、αサブユニットを分離した。こうして得られたαサブユニットをポリビニリデンフルオリド膜に転写した後、アミノ酸シークエンサー（島津製作所製、PPSQ-10）によりN末端アミノ酸配列の決定を行った。その結果、本酵素には配列番号3のアミノ酸配列においてアミノ酸番号2～12からなる11残基から構成されるペプチド配列を含むことが明らかとなった。

【0037】

<3>αサブユニットをコードする遺伝子のクローニング

<1>で調製したDNA 1 μgを制限酵素Sau3AIで限定分解した。これをCIAP（仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ）処理した。一方、コスミドであるSuperCosI（ストラジーン社から入手）をBamHI処理し、T4 DNAリガーゼにより、SuperCosIにα-15株由来の染色体DNA断片をSau3AIで限定分解して得られたDNA断片を組み込んだ。得られた組換えDNAでエシェリヒア・コリXL-1 Blue MR（ストラジーン社から入手）を形質転換した。形質転換体はSuperCosI上の抗生素質耐性であるネオマイシン耐性およびアンピシリン耐性にしたがって10 μg/mlのネオマイシンおよび25 μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地から選抜した。得られた形質転換体をLB液体培地で培養した。これらの形質転換菌体を集め後、GDH活性測定試薬に懸濁し、グルコースに対する脱水素酵素活性を指標にクローンを選抜した。その結果、1株のグルコース脱水素酵素活性を示すクローンが得られた。

【0038】

<4>サブクローニング

<3>で得られたαサブユニットをコードする遺伝子を含むコスミドSuperCosIから、目的遺伝子を含むDNA断片を調製した。同コスミドから挿入遺伝子断片を制限酵素NotIにより切り出した。このDNA断片を制限酵素XbaIで処理し、それらの断片をXbaIで消化したプラスミドpUC18に組み込んだ。各挿入断片を含むプラ

スミドpUC18でエシェリヒア・コリDH5 α MCR株を形質転換し、アンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地で生じるコロニーを採取した。得られた形質転換体を液体のLB培地で培養し、それぞれの細胞のGDH活性を<3>と同様に調べた。その結果、一つの形質転換体にGDH活性を示す株が得られた。この形質転換体からプラスミドを抽出し、その挿入DNA断片を解析したところ、約8.8kbpの挿入断片が確認された。本プラスミドをpKS1と命名した。

【0039】

<5>塩基配列の決定

pKS1の挿入DNA断片について、制限酵素解析及び常法に従い塩基配列を決定した。その結果、本挿入DNA断片中に、<2>で明かとなった α サブユニットのN末端アミノ酸配列をコードするDNA配列が確認され、この配列を含むオープンリーディングフレームが見つかった。決定した塩基配列および同塩基配列がコードし得るアミノ酸配列は、配列番号1および3に示す通りである。尚、後述するように、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号2386以降の塩基配列は、配列番号4に示すアミノ酸配列をコードしており、 β -サブユニットをコードしていると推定された。

【0040】

【参考例2】組換え大腸菌によるGDH α サブユニットの生産

α サブユニットの塩基配列が決定されたことにより、前記 α サブユニットの構造遺伝子を用いてベクターを作製し、更に前記ベクターにより形質転換体の製造を行った。

【0041】

先ずベクターに挿入する遺伝子を以下のように調製した。

K S 1 株由来のゲノム断片をテンプレートとして、所望の制限酵素部位を含むよう、PCR反応により増幅した。PCR反応には次の1組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

【0042】

(フォワード)

5' -CCCAAGCTTGGGCCGATACCGATAACGCA-3' (配列番号5)

(リバース)

5'-GAGAAGCTTCCGACGGTCAGACTTCC-3' (配列番号6)

【0043】

PCRにより増幅された遺伝子を制限酵素HindIIIで消化した後、発現ベクターpFLAG-CTS(SIGMA社)のクローニング部位であるHindIII部位に挿入した。得られたプラスミドをpFLAG-CTS/αと命名した。

【0044】

前記プラスミドpFLAG-CTS/αでエッシェリヒア・コリDH5αMCR株を形質転換し、アンピシリン50μg/mlを含むLB寒天培地で生じるコロニーを採取した。

【0045】

さらにpKS1挿入断片について、αサブユニットの上流に関してオープンリーディングフレームを検索したところ、新たに配列番号2に記載される168アミノ酸残基から構成されるポリペプチドをコードする507塩基から構成される構造遺伝子(配列番号1中塩基番号258~761)が見出された。この構造遺伝子は、γサブユニットをコードしていると考えられた。

【0046】

αサブユニットのコード領域の上流に、γサブユニットをコードする領域の存在が明らかになったことから、γサブユニットとαサブユニットが連続するポリシストロン構造の遺伝子を含む組換えベクターを作製し、同ベクターを導入した形質転換体を構築した。

【0047】

先ずベクターに挿入する遺伝子を以下のように調製した。

γサブユニットの構造遺伝子およびαサブユニットの構造遺伝子が連続するKS1株由来のゲノム断片をテンプレートとして、所望の制限酵素部位を含むように、PCR反応により増幅した。PCR反応には次の1組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

【0048】

(フォワード)

5'-CATGCCATGGCACACAACGACAACACT-3' (配列番号7)

(リバース)

5'-CCCAAGCTGGGTCAAGACTTCCTTCTTCAGC-3' (配列番号8)

【0049】

このPCRにより増幅された遺伝子の5'末端をNcoI、3'末端をHindIIIで消化した後、ベクターpTrc99A (Pharmacia社) のクローニング部位である、NcoI/HindIIIに挿入した。得られたプラスミドをpTrc99A/γ+αと命名した。

【0050】

前記プラスミドpTrc99A/γ+αにより、エシェリヒア・コリDH5αMCR株を形質転換し、アンピシリン50μg/mlを含むLB寒天培地で生じるコロニーを採取した。

【0051】

前記pKS1、pFLAG-CTS/α、pTrc99A/γ+αのそれぞれのプラスミドによって形質転換したエシェリヒア・コリDH5αMCR株を用いてαサブユニットの生産を行った。各形質転換体をアンピシリン50μg/mlを含むLB培地3mlに植菌し、37℃で12時間培養を行い、遠心分離機により細胞を集菌した。この細胞をフレンチプレス(1500kgf)で破碎した後、超遠心(4℃、160,400×g、90分)により膜画分(10mMリン酸カリウム緩衝液pH6.0)を分離した。

【0052】

【参考例3】GDH活性の確認

先ず前記各膜分画を用いてGDH活性の確認を行った。具体的には594μMのメチルフェナジンメトサルフェート(mPMS)および5.94μMの2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)により、目視判定を行った。結果は以下のとおりである。+の数は、青色から無色への変化の程度を表す。

【0053】

pFLAG-CTS/αによる形質転換体培養膜分画	+
pKS1による形質転換体培養膜分画	++
pTrc99A/γ+αによる形質転換体培養膜分画	+++

【0054】

α サブユニットのみを組みこんだ pFLAG-CTS/ α による形質転換体培養膜分画の GDH活性が最も低く、効率良くベクターを構築した pTrc99A/ $\gamma + \alpha$ による形質転換体培養膜分画が最も高いGDH活性を示した。

【0055】

α サブユニットの構造遺伝子のみによるベクターを用いた形質転換体でも α サブユニットは発現されるが、更に γ サブユニットの構造遺伝子を α サブユニットの構造遺伝子と合わせたベクターを用いることにより、効率良く α サブユニットを得ることができた。

【0056】

本発明のグルコース脱水素酵素を用いてグルコースをアッセイした。本発明のグルコース脱水素酵素(α サブユニット)を、各種濃度のグルコースで酵素活性を測定した。GDH活性の測定は $594\mu M$ のメチルフェナジンメトサルフェート(mPMS)および $5.94\mu M$ の2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)を含む $10mM$ リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)の中で行った。酵素試料および基質としてグルコースを基質として加え $37^{\circ}C$ でインキュベートした時のDCIPの $600nm$ の吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素反応速度とした。本発明のGDHを用いて、 $0.01\sim 1.0mM$ の範囲でグルコースの定量を行うことができた。

【0057】

【実施例1】ブルクホルデリア・セパシア KS1株GDH β サブユニットをコードする遺伝子の単離

<1>ブルクホルデリア・セパシア KS1株GDH β サブユニットの検索

Sanger Centre のブルクホルデリア・セパシア J2315株ゲノムデータベース(<http://www.sanger.ac.uk/>)を用いて、KS1株由来GDHの β サブユニット遺伝子を検索した。すでに明らかにされているKS1株GDH β サブユニットのN末端配列(配列番号9)を参考に、アセトバクター S p.、グルコノバクター S p. 由来のアルコール脱水素酵素 (Tamaki T. et al., Biochim Biophys Acta 1088(2):292-300 (1991)、 Matsushita K., et al., Biosci. Biotech. Biochem., 56, 304-310 (1992)、 Takemura H., et al., J Bacteriol, 175, 6857-66 (1993)、 Kondo K. et

al., Appl Environ Microbiol, 63,1131-8 (1997))、エルビニア s p.、シュードモナス s p. 由来のグルコン酸脱水素酵素 (Yum DY, et al., J Bacteriol, 179,6566-72, (1997)、Matsushita K. et al., J Biochem, 85,1173-81 (1979))、グルコノバイター s p. 由来のソルビトール脱水素酵素 (Choi, E.S., et al., FEMS Microbiol. Lett., 125, 45-50 (1995))、エルビニア s p.、パントエア s p. 由来の 2-ケトグルコン酸脱水素酵素 (Pujol CJ et al., J Bacteriol, 182,2230-7, (2000)) のシトクローム c サブユニットとホモロジーの高いアミノ酸配列 (配列番号 10) をデザインした。

【0058】

上記アミノ酸配列を指標として、前記ブルクホルデリア・セバシアJ2315株のデーターベースからBLASTを用いてホモロジーの高いアミノ酸配列をコードしている遺伝子配列を検索した。つぎに、得られた 5 つの配列に対して、KS1株GDH α サブユニットの C 末端配列とのホモロジーを検索した結果、2 つの遺伝子断片から翻訳されるアミノ酸配列が高いホモロジー (>90%) を示した。各遺伝子断片は 200~500bp と短かったので、これらの配列に対して相同性の高い配列を、Blast を用いてブルクホルデリア・セバシアJ2315株のゲノムデーターベースから検索し、各断片をつなぎ合わせた。その結果、3110bp の断片を得た。得られた塩基配列には GDH の C 末端と思われる ORF と 1275bp からなるシトクローム c 構造遺伝子と思われる ORF が存在した (配列番号 11)。同 ORF がコードするアミノ酸配列を配列番号 12 に示す。得られた J2315 株の塩基配列と既にクローニングされている KS1 株 α サブユニット塩基配列を比較した結果、 α サブユニット下流には J2315 株シトクローム c のシグナルペプチドをコードする塩基配列に相同性の高い塩基配列が含まれていた。

以上のことから、参考例 1 で得られたブルクホルデリア・セバシア KS1 株のクローニング断片中の三番目の ORF (配列番号 1 の塩基番号 2386 以降) は、 β -サブユニットをコードしていると推定された。また、精製された β -サブユニットの N 末端におけるアミノ酸配列と、配列番号 1 中の塩基番号 2452~2466 の塩基配列によって翻訳される 5 アミノ酸残基が一致したことからも、前記 ORF は β サブユニットをコードしていると考えられた。

【0059】

<2>インバースPCR法を用いた β サブユニット構造遺伝子の増幅

(1) 菌体の培養及びゲノムの抽出

KS1株を5mlの完全培地 (0.5% polypepton、0.3% yeast extract、0.5% NaCl) を用いて37°Cで一晩振とう培養した。得られた菌体からGenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech社) を用いてゲノムを抽出した。方法は付属のマニュアルに従った。得られたゲノムに対してフェノール/クロロホルム処理を行い、エタノール沈殿させた後、精製水に溶解した。

【0060】

(2) ゲノム断片の環状化

KS1株より抽出したゲノムを、BamHI、EcoRI、HindIII、SmaI、SacIおよびXhoIで消化し、エタノール沈殿によってゲノム断片を回収した。制限酵素消化したゲノム1μgをDNAライゲーションキット（宝酒造(株)）を用いて16°Cで一晩ライゲーション反応を行った。

【0061】

(3) PCR

KS1株GDH β サブユニットのN末端シグナル配列領域の塩基配列からデザインしたフォワードプライマー (EF1配列番号13) 50pmol, リバースプライマー (ER1配列番号14) 50pmol (プライマーはいずれもInvitrogen社に依託合成)、LATaq (宝バイオ(株)) 0.5ml、dNTP溶液 8μl, 10×PCR buffer 5μlに精製水を全量50μlとなるように加え、プログラムテンプレートコントロールシステム PC-801 (ASTEC) を用いてPCRを行った。PCRの反応は、以下の条件で行った。94°C 5分、98°C 20秒、62°C 30秒を30サイクルの後、72°C 6分、72°C 10分。

【0062】

SmaIで制限酵素消化したゲノムをテンプレートとした場合において、約2.1kbpの大きさの断片がアガロース電気泳動で確認された。

【0063】

<3>PCR増幅断片のシークエンシング

(1) TAクローニング

前記のインバースPCR産物をアガロースゲル電気泳動後、バンドを切り出し、Gene clean II KIT (Bio101 inc.) を用いて精製した。この断片を、pGEMR-T and pGEMR-T EASY Vector Systems (Promega) を用いて、pGEM-T Vectorにライゲーションした。ライゲーションを行ったベクターでエシェリヒア・コリDH5 α を形質転換し、アンピシリン 50 μ g/ml、X-Gal 40 μ g/ml、IPTG 0.1 μ Mを含むL寒天培地を用いて一晩培養した。出現したコロニーから白色のコロニーを選択し、アンピシリン50 μ g/mlを含むL培地で一晩培養して、菌体からプラスドをアルカリ法により抽出した。

【0064】

(2) シークエンスサンプルの調製

得られたプラスミドをRNase処理し、これに0.6倍量の20% PEG6000/2.5M NaClを加え、氷上に1時間放置した。その後15000r.p.m、4°Cで15分間遠心分離し、ペレットを得た。これを70%エタノールで洗浄し、ペレットを真空乾燥させた。これを精製水に溶解した。

【0065】

(3) DNA塩基配列の解析

(2) で得られたプラスミドの挿入断片の塩基配列を、ABI PRISM™310 Genetic Analyzer (PERKIN-ELMER Applied Biosystems)を用いて解析した。ベクターのマルチクローニングサイトからM13プライマーを用いて挿入断片の一部の配列を決定した結果、これまでに解析されている β サブユニットN末端を含む塩基配列が確認された。この配列を手がかりにプライマーを順次作製して用い、挿入断片の塩基配列を決定した。結果を配列番号15に示す。また、この塩基配列に含まれるORFがコードするアミノ酸配列を配列番号16に示す。

【0066】

β サブユニットは、全部で425個のアミノ酸残基から構成されており、すでに得られているN末端アミノ酸配列と比較して、そのうち22残基はシグナルペプチドであると考えらる。アミノ酸配列から計算される分子量は45,276Daであり、シグナルペプチドを除いた分子量42,731Daは、SDS-PAGEから求められたKS1株GDH β

サブユニットの分子量43kDaとほぼ同等の値であった。βサブユニットのアミノ酸配列中には、シトクロームcにおいてヘムとの結合モチーフ（配列番号18）が3ヶ所に確認された。このORFはαサブユニット構造遺伝子のORFのすぐ下流に位置し、開始コドンの上流にSD配列と思われる配列が存在した。

【0067】

得られたアミノ酸配列についてBLASTによるホモロジー検索を行ったところ、ラルストニア・ソアナセアルム (*Ralstonia solanacearum*) 由来のオキシドレダクターゼ脱水素酵素のシトクロムcサブユニットと65%、グルコノバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) 由来のソルビトール脱水素酵素のシトクロムcサブユニットと48%、エルビニア・シプリペディイ (*Eriwinia cypripedii*) 由来のグルコン酸脱水素酵素のシトクロムcサブユニットと44%、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) 由来2-ケトグルコン酸脱水素酵素のシトクロムcサブユニットとアミノ酸レベルで46.4%と、全体にわたって高い相同意を示していた。またこれらのシトクロムcのアミノ酸配列中には、ヘム結合モチーフ（配列番号18）配列が保存されていた。

尚、KS1株のGDHβサブユニット構造遺伝子は、J2315株のGDHβサブユニット構造遺伝子と、塩基配列レベルで92.0%、アミノ酸レベルで92.2%の相同性を有している。

【0068】

【発明の効果】

本発明により、ブルクホルデリア属微生物のGDHβサブユニット及びそれをコードするDNAが提供される。

【0069】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SODE, Koji

<120> Glucose dehydrogenase beta-subunit and DNA encoding the same

<130> P-9842

<141> 2002-04-26

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0070】

<210> 1

<211> 2467

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (258)..(761)

<220>

<221> CDS

<222> (764)..(2380)

<220>

<221> CDS

<222> (2386)..(2466)

<400> 1

aagtttctg tttgattgca cgcgattcta accgagcgtc tgtgaggcgg aacgcgacat 60
gcttcgtgtc gcacacgtgt cgcgccgacg acacaaaaat gcagcgaaat ggctgatcgt 120

tacgaatggc tgacacattg aatggactat aaaaccattg tccgttccgg aatgtgcgcg 180
 tacatttcag gtccgcgcg attttgaga aatatcaagc gtggtttcc cgaatccgg 240
 gttcgagaga aggaaac atg cac aac gac act ccc cac tcg cgt cgc 290

Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg

1 5 10

cac ggc gac gca gcc gca tca ggc atc acg cgg cgt caa tgg ttg caa 338

His Gly Asp Ala Ala Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln

15 20 25

ggc gcg ctg gcg ctg acc gca gcg ggc ctc acg ggt tcg ctg aca ttg 386

Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu

30 35 40

cgg gcg ctt gca gac aac ccc ggc act gcg ccg ctc gat acg ttc atg 434

Arg Ala Leu Ala Asp Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met

45 50 55

acg ctt tcc gaa tcg ctg acc ggc aag aaa ggg ctc agc cgc gtg atc 482

Thr Leu Ser Glu Ser Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile

60 65 70 75

ggc gag cgc ctg ctg cag gcg ctg cag aag ggc tcg ttc aag acg gcc 530

Gly Glu Arg Leu Leu Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala

80 85 90

gac agc ctg ccg cag ctc gcc ggc gcg ctc gcg tcc ggt tcg ctg acg 578

Asp Ser Leu Pro Gln Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr

95 100 105

cct gaa cag gaa tcg ctc gca ctg acg atc ctc gag gcc tgg tat ctc 626

Pro Glu Gln Glu Ser Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu

110 115 120

ggc atc gtc gac aac gtc gtg att acg tac gag gaa gca tta atg ttc 674

Gly Ile Val Asp Asn Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe

125 130 135

ggc gtc gtg tcc gat acg ctc gtg atc cgt tcg tat tgc ccc aac aaa 722
 Gly Val Val Ser Asp Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys
 140 145 150 155
 ccc ggc ttc tgg gcc gac aaa ccg atc gag agg caa gcc tg atg gcc 769
 Pro Gly Phe Trp Ala Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala Met Ala
 160 165 170
 gat acc gat acg caa aag gcc gac gtc gtc gtt gga tcg ggt gtc 817
 Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser Gly Val
 175 180 185
 gcg ggc gcg atc gtc gcg cat cag ctc gcg atg gcg ggc aag gcg gtg 865
 Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys Ala Val
 190 195 200
 atc ctg ctc gaa gcg ggc ccg cgc atg ccg cgc tgg gaa atc gtc gag 913
 Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile Val Glu
 205 210 215
 cgc ttc cgc aat cag ccc gac aag atg gac ttc atg gcg ccg tac ccg 961
 Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro Tyr Pro
 220 225 230
 tcg agc ccc tgg gcg ccg cat ccc gag tac ggc ccg ccg aac gac tac 1009
 Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn Asp Tyr
 235 240 245 250
 ctg atc ctg aag ggc gag cac aag ttc aac tcg cag tac atc cgc gcg 1057
 Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile Arg Ala
 255 260 265
 gtg ggc ggc acg acg tgg cac tgg gcc gcg tcg gcg tgg cgc ttc att 1105
 Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg Phe Ile
 270 275 280
 ccg aac gac ttc aag atg aag agc gtg tac ggc gtc ggc cgc gac tgg 1153
 Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg Asp Trp

285	290	295	
ccg atc cag tac gac gat ctc gag ccg tac tat cag cgc gcg gag gaa			1201
Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala Glu Glu			
300	305	310	
gag ctc ggc gtg tgg ggc ccg ggc ccc gag gaa gat ctg tac tcg ccg			1249
Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr Ser Pro			
315	320	325	330
cgc aag cag ccg tat ccg atg ccg ccg ctg ccg ttg tcg ttc aac gag			1297
Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe Asn Glu			
335	340	345	
cag acc atc aag acg gcg ctg aac aac tac gat ccg aag ttc cat gtc			1345
Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe His Val			
350	355	360	
gtg acc gag ccg gtc gcg cgc aac agc cgc ccg tac gac ggc cgc ccg			1393
Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly Arg Pro			
365	370	375	
act tgt tgc ggc aac aac aac tgc atg ccg atc tgc ccg atc ggc gcg			1441
Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile Gly Ala			
380	385	390	
atg tac aac ggc atc gtg cac gtc gag aag gcc gaa cgc gcc ggc gcg			1489
Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala Gly Ala			
395	400	405	410
aag ctg atc gag aac gcg gtc gtc tac aag ctc gag acg ggc ccg gac			1537
Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly Pro Asp			
415	420	425	
aag cgc atc gtc gcg gcg ctc tac aag gac aag acg ggc gcc gag cat			1585
Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala Glu His			
430	435	440	
cgc gtc gaa ggc aag tat ttc gtg ctc gcc gcg aac ggc atc gag acg			1633

Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile Glu Thr
 445 450 455
 ccg aag atc ctg ctg atg tcc gcg aac cgc gat ttc ccg aac ggt gtc 1681
 Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn Gly Val
 460 465 470
 gcg aac agc tcg gac atg gtc ggc cgc aac ctg atg gac cat ccg ggc 1729
 Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His Pro Gly
 475 480 485 490
 acc ggc gtg tcg ttc tat gcg agc gag aag ctg tgg ccg ggc cgc ggc 1777
 Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly Arg Gly
 495 500 505
 ccg cag gag atg acg tcg ctg atc ggt ttc cgc gac ggt ccg ttc cgc 1825
 Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro Phe Arg
 510 515 520
 gcg acc gaa gcg gcg aag aag atc cac ctg tcg aac ctg tcg cgc atc 1873
 Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser Arg Ile
 525 530 535
 gac cag gag acg cag aag atc ttc aag gcc ggc aag ctg atg aag ccc 1921
 Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met Lys Pro
 540 545 550
 gac gag ctc gac gcg cag atc cgc gac cgt tcc gca cgc tac gtg cag 1969
 Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr Val Gln
 555 560 565 570
 ttc gac tgc ttc cac gaa atc ctg ccg caa ccc gag aac cgc atc gtg 2017
 Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg Ile Val
 575 580 585
 ccg agc aag acg gcg acc gat gcg atc ggc att ccg cgc ccc gag atc 2065
 Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro Glu Ile
 590 595 600

acg tat gcg atc gac gac tac gtg aag cgc ggc gcc gcg cat acg cgc 2113
 Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His Thr Arg
 605 610 615
 gag gtc tac gcg acc gcc gcg aag gtg ctc ggc ggc acg gac gtc gtg 2161
 Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp Val Val
 620 625 630
 ttc aac gac gaa ttc gcg ccg aac aat cac atc acg ggc tcg acg atc 2209
 Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser Thr Ile
 635 640 645 650
 atg ggc gcc gat gcg cgc gac tcc gtc gtc gac aag gac tgc cgc acg 2257
 Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys Arg Thr
 655 660 665
 ttc gac cat ccg aac ctg ttc att tcg agc agc gcg acg atg ccg acc 2305
 Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met Pro Thr
 670 675 680
 gtc ggt acc gta aac gtg acg ctg acg atc gcc gcg ctc gcg ctg cgg 2353
 Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala Leu Arg
 685 690 695
 atg tcg gac acg ctg aag aag gaa gtc tgacc gtg cgg aaa tct act ctc 2403
 Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val Val Arg Lys Ser Thr Leu
 700 705 710
 act ttc ctc atc gcc ggc tgc ctc gcg ttg ccg ggc ttc gcg cgc gcg 2451
 Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu Pro Gly Phe Ala Arg Ala
 715 720 725
 gcc gat gcg gcc gat c 2467
 Ala Asp Ala Ala Asp
 730
 [0071]
 <210> 2

<211> 168

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 2

Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg His Gly Asp Ala Ala

1 5 10 15

Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln Gly Ala Leu Ala Leu

20 25 30

Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu Arg Ala Leu Ala Asp

35 40 45

Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met Thr Leu Ser Glu Ser

50 55 60

Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile Gly Glu Arg Leu Leu

65 70 75 80

Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala Asp Ser Leu Pro Gln

85 90 95

Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr Pro Glu Gln Glu Ser

100 105 110

Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu Gly Ile Val Asp Asn

115 120 125

Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe Gly Val Val Ser Asp

130 135 140

Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys Pro Gly Phe Trp Ala

145 150 155 160

Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala

165

【0072】

<210> 3

<211> 539

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 3

Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
 20 25 30

Ala Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
 35 40 45

Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro
 50 55 60

Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
 65 70 75 80

Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
 85 90 95

Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
 100 105 110

Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg
 115 120 125

Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala
 130 135 140

Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
 145 150 155 160

Ser Pro Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
 165 170 175

Asn Glu Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe
 180 185 190

His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly
 195 200 205
 Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile
 210 215 220
 Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala
 225 230 235 240
 Gly Ala Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly
 245 250 255
 Pro Asp Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala
 260 265 270
 Glu His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile
 275 280 285
 Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn
 290 295 300
 Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His
 305 310 315 320
 Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly
 325 330 335
 Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro
 340 345 350
 Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser
 355 360 365
 Arg Ile Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met
 370 375 380
 Lys Pro Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr
 385 390 395 400
 Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg
 405 410 415
 Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro

420	425	430
Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His		
435	440	445
Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp		
450	455	460
Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser		
465	470	475
Arg Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys		
485	490	495
Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met		
500	505	510
Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala		
515	520	525
Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val		
530	535	

【0073】

<210> 4
<211> 27
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 4

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu			
1	5	10	15
Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp			
20	25		

【0074】

<210> 5
<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

cccaagcttg ggccgatacc gatacgca

28

[0075]

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

gagaagcttt ccgcacggtc agacttcc

29

[0076]

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7

catgccatgg cacacaacga caacact

27

【0077】

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8

cccaagcttg ggtcagactt ccttcttcag c

31

【0078】

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 9

Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala

1

5

10

15

【0079】

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus

<220>

<221> UNSURE

<222> (6,17,18,19,22)

<223> Xaa=unknown

<400> 10

Ala Asp Ala Ala Asp Xaa Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala

1

5

10

15

Xaa Xaa Xaa Asp Cys Xaa Ala Cys His

20

25

[0080]

<210> 11

<211> 2410

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (673)..(1950)

<400> 11

gatggaccac ccgggcacccg gcgtgtcggtt ctacgcgaac gagaagctgt ggccgggccc 60
 cggcccgccag gatatgacgt cgctgatcgg tttccgcgac ggcccggtcc gcgcgaccga 120
 agccgcgaag aagatccatc tgtcgaacat gtccgcac tc aaccaggaga cgcagaagat 180
 cttcaaggcc ggcaaactga tgaagcacga ggagctcgac gcgcagatcc gcgaccgttc 240
 cgcgcgtac gtgcagttcg actgcttcca cgagattctg ccgcagcccg agaacccat 300
 cgtgccgagc aagacggcca ccgacgcgtat cggatcccg cgccccgaga tcacgtatgc 360
 gatgcacgtatc tacgtgaagc gcggcgccgt gcacacgcgc gaggtctacg cgacggccgc 420

gaagggtgctg ggcggcaccg acgtcgctt caacgacgag ttcgcgccga acaaccat 480
 cacgggcgcg aggatcatgg gcgcggatgc acgcgactcg gtcgtcgaca aggactgccg 540
 cacgttcgac catccgaacc tgttcctctc gagcagctcg acgatgccga ccgtcggtac 600
 ggtgaacgtg acgctgacga tcgcggcgct cgcgctgcgg atgtcggaca cgctgaagaa 660
 ggaagtctga cc gtg cgg aaa tct act ctc acc ttc ctc ctc gcc ggc tgc 711
 Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Leu Ala Gly Cys
 1 5 10
 ctc gcg ctg ccc ggc ctc gca cgc gcg gcc gat tcg gcc gat ccg gcg 759
 Leu Ala Leu Pro Gly Leu Ala Arg Ala Ala Asp Ser Ala Asp Pro Ala
 15 20 25
 cat gtc aag cgc ggc gaa tac ctc gcc gtc gcg ggc gac tgc atg gca 807
 His Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Val Ala Gly Asp Cys Met Ala
 30 35 40 45
 tgc cac acc gcg aag ggc ggc aag ccg ttc gcg ggc ggc ctc ggc atg 855
 Cys His Thr Ala Lys Gly Gly Lys Pro Phe Ala Gly Gly Leu Gly Met
 50 55 60
 ccg gtg ccg atg ctc ggc aag atc tat acg agc aac atc aca ccg gat 903
 Pro Val Pro Met Leu Gly Lys Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp
 65 70 75
 ccc gat acc ggc atc ggc aac tgg acg ttc gag gac ttc gag cgc gcg 951
 Pro Asp Thr Gly Ile Gly Asn Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala
 80 85 90
 gtg cgg cac ggc gta tcg aag aac ggc gac aac ctg tac ccg gcg atg 999
 Val Arg His Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met
 95 100 105
 ccg tac gtg tcg tac gcg aag atc aac gac gac gac gtg caa gcg ctg 1047
 Pro Tyr Val Ser Tyr Ala Lys Ile Asn Asp Asp Asp Val Gln Ala Leu
 110 115 120 125
 tac gcg tac ttc atg cac ggc gtc gaa ccg gtc aag cag gcg ccg 1095

Tyr Ala Tyr Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro
 130 135 140
 aag aac gag atc ccc gcg ctg ctg agc atg cgc tgg ccg ctg aag atc 1143
 Lys Asn Glu Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile
 145 150 155
 tgg aac tgg ctg ttc ctg aag gac ggc gtg tac cag ccg aag ccc gag 1191
 Trp Asn Trp Leu Phe Leu Lys Asp Gly Val Tyr Gln Pro Lys Pro Glu
 160 165 170
 cag agc gcc gag tgg aac cgc ggc gcc tat ctc gtg cag ggc ctc gcg 1239
 Gln Ser Ala Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala
 175 180 185
 cac tgc agc acg tgc cac acg ccg cgc ggc atc gcg atg cag gag aag 1287
 His Cys Ser Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys
 190 195 200 205
 tcg ctc gac gaa acg ggc ggc agc ttc ctg tcg ggc tcg gtg ctc gcg 1335
 Ser Leu Asp Glu Thr Gly Ser Phe Leu Ser Gly Ser Val Leu Ala
 210 215 220
 ggc tgg gac ggc tac aac atc acg tcc gac ccg aac gcg ggg atc ggc 1383
 Gly Trp Asp Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly
 225 230 235
 ggc tgg acg cag cag ctc gtc cag tac ctg cgc acc ggc agc gtg 1431
 Gly Trp Thr Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val
 240 245 250
 ccg ggc ctc gcg cag gcg gcc ggc ccg atg gcc gag gcg atc gag cac 1479
 Pro Gly Leu Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Ile Glu His
 255 260 265
 agc ttc tcg aag atg acc gaa gcc gac atc ggc ggc ccg atg gcc gag 1527
 Ser Phe Ser Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Gly Pro Met Ala Glu
 270 275 280 285

gcg atc gag cac agc ttc tcg aag atg acc gaa gcc gac atc ggc cgc 1575
 Ala Ile Glu His Ser Phe Ser Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Arg
 290 295 300
 tcg tcg tgg ggc aag ccg gcc gag gat ggc ctg aag ctg cgc ggc gtc 1623
 Ser Ser Trp Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val
 305 310 315
 gcg ctc gcg tcg tcg ggc atc gat ccg gca ccg ctg tat ctc ggc aac 1671
 Ala Leu Ala Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Pro Leu Tyr Leu Gly Asn
 320 325 330
 tgc gcg acc tgc cac cag atg cag ggc aag ggc acg ccg gac ggt tac 1719
 Cys Ala Thr Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr
 335 340 345
 tac ccg ccg ttg ttc cac aac tcg acg gtc ggc gcg tcg aat ccg acc 1767
 Tyr Pro Pro Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Thr
 350 355 360 365
 aac ctc gtg cag gtg atc ctg aac ggc gtg cag cgc aag gcc ggc agc 1815
 Asn Leu Val Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ala Gly Ser
 370 375 380
 gag gac gtc ggg atg ccc gcg ttc cgc cac gag ctg tcg gat gcg cag 1863
 Glu Asp Val Gly Met Pro Ala Phe Arg His Glu Leu Ser Asp Ala Gln
 385 390 395
 atc gcc gcg ctg acg aac tac ctg acg ggg cag ttc ggc aat ccg gcc 1911
 Ile Ala Ala Leu Thr Asn Tyr Leu Thr Gly Gln Phe Gly Asn Pro Ala
 400 405 410
 gcg aag gtg acc gag cag gac gtc gcg aag ctg cgc tga aacgcggcac 1960
 Ala Lys Val Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
 415 420 425
 gcggcgaggc agggcaacaa tagaaaagag gaggagcaca gcacatcggg cggccccga 2020
 tgccggttgt tgcatagcgg gacggcgcc gcaggcggtc gcccgtcctg gttcacaggg 2080

aatccgggtgc gcgcacgccc cgcatcgtt tcgttgcgtc agaccatgac accgaaccaa 2140
 ccgtttctcg cgtcccagcg cgatgtgctg ctgctgctgt cccgaatcct gctcgtgatc 2200
 ctgttcgtga tggtcggctg gaagaagatt atcgacttct ccggtaacat cgcgttcatg 2260
 ggcagcggagg ggcgcgccggc gccgatcatc tcggcggcga tctccgtcgt gatggagctc 2320
 atcgtcggga ttgcgatcct cgtcggttcc cagacgcggc cgctcgcgcgt gttgcttgcg 2380
 ctgtacacga tcggtaccgg catcatcgcc 2410

【0081】

<210> 12

<211> 425

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 12

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Leu Ala Gly Cys Leu Ala Leu

1

5

10

15

Pro Gly Leu Ala Arg Ala Ala Asp Ser Ala Asp Pro Ala His Val Lys

20

25

30

Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Val Ala Gly Asp Cys Met Ala Cys His Thr

35

40

45

Ala Lys Gly Gly Lys Pro Phe Ala Gly Gly Leu Gly Met Pro Val Pro

50

55

60

Met Leu Gly Lys Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp Pro Asp Thr

65

70

75

80

Gly Ile Gly Asn Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His

85

90

95

Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val

100

105

110

Ser Tyr Ala Lys Ile Asn Asp Asp Asp Val Gln Ala Leu Tyr Ala Tyr

115

120

125

Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu
 130 135 140
 Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp
 145 150 155 160
 Leu Phe Leu Lys Asp Gly Val Tyr Gln Pro Lys Pro Glu Gln Ser Ala
 165 170 175
 Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser
 180 185 190
 Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp
 195 200 205
 Glu Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ser Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp
 210 215 220
 Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Gly Trp Thr
 225 230 235 240
 Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Leu
 245 250 255
 Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Ile Glu His Ser Phe Ser
 260 265 270
 Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Gly Pro Met Ala Glu Ala Ile Glu
 275 280 285
 His Ser Phe Ser Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Arg Ser Ser Trp
 290 295 300
 Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala
 305 310 315 320
 Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Pro Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr
 325 330 335
 Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Pro
 340 345 350
 Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Thr Asn Leu Val

355	360	365	
Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ala Gly Ser Glu Asp Val			
370	375	380	
Gly Met Pro Ala Phe Arg His Glu Leu Ser Asp Ala Gln Ile Ala Ala			
385	390	395	400
Leu Thr Asn Tyr Leu Thr Gly Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val			
405	410	415	
Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg			
420	425		

【0082】

<210> 13
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13
tgccacgtgc ggaaatctac ttcact 27

【0083】

<210> 14
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14

acttccttct tcagcgtgtc cgacatc

27

[0084]

<210> 15

<211> 1441

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (121)..(1398)

<400> 15

tccgaacctg ttcatttcga gcagcgcgac gatgccgacc gtcggtaaccg taaacgtgac 60
 gctgacgatc gccgcgctcg cgctgcggat gtcggacacg ctgaagaagg aagtctgacc 120
 gtg cgg aaa tct act ctc act ttc ctc atc gcc ggc tgc ctc gcg ttg 168
 Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu

1

5

10

15

ccg ggc ttc gcg cgc gcg gcc gat gcg gcc gat ccg gcg ctg gtc aag 216
 Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys

20

25

30

cgc ggc gaa tac ctc gcg acc gcc atg ccg gta ccg atg ctc ggc aag 264
 Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Thr Ala Met Pro Val Pro Met Leu Gly Lys

35

40

45

atc tac acg agc aac atc acg ccc gat ccc gat acg ggc gac tgc atg 312
 Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp Pro Asp Thr Gly Asp Cys Met

50

55

60

gcc tgc cac acc gtg aag ggc aag ccg tac gcg ggc ggc ctt ggc 360
 Ala Cys His Thr Val Lys Gly Lys Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly

65	70	75	80
ggc atc ggc aaa tgg acg ttc gag gac ttc gag cgc gcg gtg cgg cac			408
Gly Ile Gly Lys Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His			
85	90	95	
ggc gtg tcg aag aac ggc gac aac ctg tat ccg gcg atg ccg tac gtg			456
Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val			
100	105	110	
tcg tac gcg aag atc aag gac gac gta cgc gcg ctg tac gcc tac			504
Ser Tyr Ala Lys Ile Lys Asp Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr			
115	120	125	
ttc atg cac ggc gtc gag ccg gtc aag cag gcg ccg ccg aag aac gag			552
Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu			
130	135	140	
atc cca gcg ctg cta agc atg cgc tgg ccg ctg aag atc tgg aac tgg			600
Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp			
145	150	155	160
ctg ttc ctg aag gac ggc ccg tac cag ccg aag ccg tcg cag agc gcc			648
Leu Phe Leu Lys Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Lys Pro Ser Gln Ser Ala			
165	170	175	
gaa tgg aat cgc ggc gcg tat ctg gtg cag ggt ctc gcg cac tgc agc			696
Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser			
180	185	190	
acg tgc cac acg ccg cgc ggc atc gcg atg cag gag aag tcg ctc gac			744
Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp			
195	200	205	
gaa acc ggc ggc agc ttc ctc gcg ggg tcg gtg ctc gcc ggc tgg gac			792
Glu Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp			
210	215	220	
ggc tac aac atc acg tcg gac ccg aat gcg ggg atc ggc agc tgg acg			840

Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr
 225 230 235 240
 cag cag cag ctc gtg cag tat ttg cgc acc ggc agc gtg ccg ggc gtc 888
 Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val
 245 250 255
 gcg cag gcg gcc ggg ccg atg gcc gag gcg gtc gag cac agc ttc tcg 936
 Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser
 260 265 270
 aag atg acc gaa gcg gac atc ggt gcg atc gcc acg tac gtc cgc acg 984
 Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr
 275 280 285
 gtg ccg gcc gtt gcc gac agc aac gcg aag cag ccg cgg tcg tcg tgg 1032
 Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp
 290 295 300
 ggc aag ccg gcc gag gac ggg ctg aag ctg cgc ggt gtc gcg ctc gcg 1080
 Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala
 305 310 315 320
 tcg tcg ggc atc gat ccg gcg cgg ctg tat ctc ggc aac tgc gcg acg 1128
 Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr
 325 330 335
 tgc cac cag atg cag ggc aag ggc acg ccg gac ggc tat tac ccg tcg 1176
 Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser
 340 345 350
 ctg ttc cac aac tcc acc gtc ggc gcg tcg aat ccg tcg aac ctc gtg 1224
 Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val
 355 360 365
 cag gtg atc ctg aac ggc gtg cag cgc aag atc ggc agc gag gat atc 1272
 Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile
 370 375 380

ggg atg ccc gct ttc cgc tac gat ctg aac gac gcg cag atc gcc gcg 1320
 Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala
 385 390 395 400
 ctg acg aac tac gtg acc gcg cag ttc ggc aat ccg gcg gcg aag gtg 1368
 Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val
 405 410 415
 acg gag cag gac gtc gcg aag ctg cgc tga catagtcggg cgccgacaca 1418
 Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
 420 425

cggcgcaacc gataggacag gag 1441

[0085]

<210> 16

<211> 425

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 16

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu

1 5 10 15

Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys

20 25 30

Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Thr Ala Met Pro Val Pro Met Leu Gly Lys

35 40 45

Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp Pro Asp Thr Gly Asp Cys Met

50 55 60

Ala Cys His Thr Val Lys Gly Gly Lys Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly

65 70 75 80

Gly Ile Gly Lys Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His

85 90 95

Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val
 100 105 110
 Ser Tyr Ala Lys Ile Lys Asp Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr
 115 120 125
 Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu
 130 135 140
 Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp
 145 150 155 160
 Leu Phe Leu Lys Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Lys Pro Ser Gln Ser Ala
 165 170 175
 Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser
 180 185 190
 Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp
 195 200 205
 Glu Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp
 210 215 220
 Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr
 225 230 235 240
 Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val
 245 250 255
 Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser
 260 265 270
 Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr
 275 280 285
 Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp
 290 295 300
 Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala
 305 310 315 320
 Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr

325	330	335
Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser		
340	345	350
Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val		
355	360	365
Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile		
370	375	380
Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala		
385	390	395
Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val		
405	410	415
Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg		
420	425	

【0086】

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: heme binding motif

<220>

<221> UNSURE

<222> (2,3)

<223> Xaa=unknown

<400> 17

Cys Xaa Xaa Cys His

1

5

【0087】

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 18

catgccatgg cacacaacga caacact

27

【0088】

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 19

cccaagcttg ggtcagactt ccttcttcag c

31

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ブルクホルデリア属微生物のGDH β サブユニットをコードするDN

A、及びその利用法を提供する。

【解決手段】 ブルクホルデリア・セバシアKS1株由来GDHの β サブユニットのN末端シグナル配列領域の塩基配列からデザインしたプライマーを用いたインバースPCRにより、 β サブユニットをコードする配列番号15に示す塩基配列を有するDNA断片を得る。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [596153357]

1. 変更年月日 1996年10月 1日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都目黒区南1-13-16

氏 名 早出 広司

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.